

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 27 日 (27.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/70975 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K
14/705, 16/28, C12N 1/15, 1/19, 5/10, C12P 21/02, C12Q
1/02, A61K 45/00, A61P 3/04, 25/00

田 環 (ODA, Tamaki) [JP/JP]; 〒292-0054 千葉県木更津市長須賀 392-203 Chiba (JP). 斎藤洋子 (SAITO, Youko) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木更津市東太田 4-5-13-103 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02343

(22) 国際出願日: 2001 年 3 月 23 日 (23.03.2001)

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) 優先権データ:
特願 2000-88588 2000 年 3 月 24 日 (24.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町 2 丁目 3 番 11 号 Tokyo (JP). 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那 1532 番地 3 Chiba (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鞍馬岳吏 (KURAMA, Takeshi) [JP/JP]. 松本俊一郎 (MATSUMOTO, Shunichiro) [JP/JP]. 高崎 淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP]. 松本光之 (MATSUMOTO, Mitsuyuki) [JP/JP]. 蒲原正純 (KAMOHARA, Masazumi) [JP/JP]. 齋藤 哲 (SAITO, Tetsu) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 小

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL MELANIN CONCENTRATING HORMONE RECEPTOR

(54) 発明の名称: 新規なメラニンコンセンレーティングホルモン受容体

(57) Abstract: A cDNA encoding a novel melanin concentrating hormone receptor protein is isolated. Provision of this novel melanin concentrating hormone receptor protein enables binding experiments with the use of this protein. By screening a substance modifying the activity of the melanin concentrating hormone receptor based on the binding experiments, drugs targeting this protein can be developed.

(57) 要約:

新規なメラニンコンセンレーティングホルモン受容体蛋白質をコードする cDNA を単離した。新規蛋白質であるメラニンコンセンレーティングホルモン受容体の提供により、この蛋白質を用いた結合実験が可能となった。結合実験に基づくメラニンコンセンレーティングホルモン受容体の活性を修飾する物質のスクリーニングによって、この蛋白質を標的とする医薬開発が可能となる。

- 1 -

明細書

新規なメラニンコンセントレーティングホルモン受容体

技術分野

本発明は、新規なメラニンコンセントレーティングホルモン受容体、該受容体をコードしている遺伝子、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターを含有する宿主細胞及び該受容体を使用した薬物スクリーニング法に関する。また本発明は、前記受容体活性を修飾する物質、該物質を用いた肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療のための方法、並びに医薬組成物に関する。

背景技術

メラニンコンセントレーティングホルモン(Melanin-Concentrating-Hormone、以下 MCH)は、鮭の下垂体より初めて単離された環状ペプチドホルモンである(Kawachi, H. et al. (1983) Nature 305, 321-323)。魚類においてはメラノサイトスティミュレーティングホルモンと機能的に拮抗し、メラノフォアの凝集を引き起こし体色の適応変化に関与している(Bittencourt, J.C. et al. (1992) J.Comp. Neurol. 319, 218-245)。その後、ラット、ヒトなどでも MCH 前駆体 cDNA のクローニングが行われ(Nahon, J.L. et al. (1989) Endocrinology 125, 2056-2065, Presse, F. et al. (1990) Mol. Endocrinol. 4, 632-637)、エネルギーホメオスタシスの調節など幅広い生理機能を果たすことが明らかになってきた。

MCH は、ラット、ヒトなどでは、主に外側視床下部、不確帯で発現されている(Bittencourt, J.C. et al. (1992) J.Comp.Neurol. 319, 218-245, Viale, A. et al. (1997) Brain Res Mol Brain Res 46, 243-255)。

外側視床下部は以下の知見より、古くから摂食中枢として働くことが知られていた。

- 2 -

- (1)外側視床下部の破壊により摂食行動の抑制、消失が認められる。(Anand, B.K. & Brobeck, J.R. (1951) Yale J Biol Med 24, 123-140)
- (2)外側視床下部の電気刺激により摂食行動の亢進、可逆的な肥満が認められる。(Steinbaum, E.A. & Miller, N.E. (1965) Am J Physiol 208, 1-5)
- (3)飢餓状態では外側視床下部の神経活動は、満腹中枢として知られる腹内側核より高い。(Anand, B.K. & Pillai, R.V. (1967) J Physiol 192, 63-77)グルコースを与えたり、胃内に設置された風船で胃を膨張させると外側視床下部の神経発火頻度は低下する。(Anand, B.K. et al. (1964) Am J Physiol 207, 1146-1154; Anand, B.K. & Pillai, R.V. (1967) J Physiol 192, 63-77)グルコース利用率を低下させる2-デオキシグルコースを投与すると、外側視床下部の神経発火頻度は増加する。(Desiraju, T. et al. (1968) Physiol Behav 3, 757-760)
- (4)絶食したサルでは酸素消費量が外側視床下部で増加し、腹内側核では逆に低下する。(Anand, B.K. et al. (1961) Indian J Med Res 49, 725-732)

レプチンの遺伝子に変異が生じ肥満を呈した ob/ob マウスや絶食したマウスの視床下部において、MCH 遺伝子の発現が亢進することが報告されている(Qu, D. et al. (1996) Nature 380, 243-247)。レプチンは、体脂肪量を感知し、これを適正な量に維持する作用をもつホルモンである。

実際に、MCH をラットの脳室内に投与すると用量依存的な摂食の亢進がおきる(Qu, D. et al. (1996) Nature 380, 243-247, Ludwig, D.S. et al. (1998) Am. J. Physiol. 274, E627-E633)。MCH 遺伝子を欠失したマウスは野生型マウスに比べ、体脂肪の減少に基づく体重減少が観察され、摂食量の減少や体重あたりの酸素消費量の増加が観察された(Shimada, M. et al. (1998) Nature 396, 670-674)。また、MCH は他のエネルギーホメオスタシスに関与する因子と調節関係にあることも知られている。メラノサイトスティミュレーティングホルモン (以下、MSH と記載する) はメラノコルチン 4 受容体(Melanocortin-4 receptor、以下 MC4R

と記載する)を介して、摂食抑制作用を示し、体内へのエネルギー蓄積量を減少させることが知られている(Friedman, J.M. (1997) *Nature* 385, 119-120, Lu, D. et al. (1994) *Nature* 371, 799-802, Huszar, D. et al. (1997) *Cell* 88, 131-141)。

魚類の体色変化における拮抗関係と同様に、ほ乳類の摂食行動においても、MCHとMSHは互いに相反する作用を示す。MCHにより誘発された摂食亢進は α -MSHにより抑制され、逆に α -MSHによる摂食抑制作用はMCHにより解除される(Ludwig, D.S. et al. (1998) *Am.J.Physiol.* 274, E627-E633)。しかし、MCH自身はMC4Rに親和性はなく、 α -MSHとMC4Rの結合を阻害できないことから、独自の受容体を介してその作用を示すものと推察されていた(Ludwig, D.S. et al. (1998) *Am.J.Physiol.* 274, E627-E633)。

メラノコルチン系が不全となっているAy/aマウスやMC4Rの内在性阻害蛋白であるAGRPを投与したラットでは外側視床下部でMCH遺伝子の発現上昇がおきる(Hanada, R. et al. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 268, 88-91)。また、MCHによる摂食亢進作用は、レプチン、ニューロテンシン、GLP-1などの摂食抑制因子によって抑制される(Sahu, A. (1998) *Endocrinology* 139, 4739-4741, Tritos, N.A. et al. (1998) *Diabetes* 47, 1687-92)。

以上の様な事実から、生体内でMCHは種々のエネルギーホメオスタシス調節因子と関係しあいながら、それ自身は摂食亢進作用やエネルギー消費抑制作用を示しエネルギーバランスの調節を担っているものと考えられている。

MCHは以上の様な作用の他にも、次に示すような作用が報告されている。

- ・受動回避において記憶の消去を促進する作用(McBride, R.B. et al. (1994) *Peptides* 15, 757-759)
- ・メスのラット内側視索前部や腹内側核へ投与すると、性的受容性を亢進する作用(Gonzalez, M.I. et al. (1996) *Peptides* 17, 171-177)
- ・ラット内側視索前部へ投与すると、不安を惹起する作用(Gonzalez, M.I. et al.

- 4 -

1. (1996) Peptides 17, 171-177)
- ・聴覚刺激誘発海馬応答を抑制する作用(Miller,C.L. (1993) Peptides 14, 431-440)
 - ・羊の脳室内に投与すると、利尿作用、尿中へのナトリウム、カリウムの排泄を促進する作用(Parkes,D.G. (1996) J.Neuroendocrinol. 8, 57-63)
- 更に、ヒトにおける MCH 受容体として、SLC-1 が報告されている(Saito,Y. et al. (1999) Nature 400, 265-269)。SLC-1 は、もともと G 蛋白質共役型受容体の一つであるソマトスタチン受容体との相同性に基づいて単離された遺伝子である(Kolakowski,L.F. et al. (1996) FEBS Lett.398, 253-258)。ソマトスタチン受容体遺伝子との相同性は約 40%程度で、ソマトスタチンとの結合活性は見出されなかったが、その後の研究によりリガンドが MCH であることが明らかにされた。

発明の開示

本発明の目的は、新規なヒトのメラニンコンセントレーティングホルモン (MCH) 受容体または該受容体と同等の機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供することである。また、本発明の別の目的は、該遺伝子を用いて発現させたヒトの MCH 受容体または該受容体と同様の機能を有する蛋白質を提供することである。さらに本発明は、本発明の MCH 受容体を使用した MCH 受容体の活性を修飾する薬物のスクリーニング法の提供を目的としている。加えて本発明は、前記受容体活性を修飾する物質、該物質を用いた肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療のための方法、並びに医薬組成物の提供も目的としている。

本発明者らは、鋭意研究を行なった結果、新規なヒトの MCH 受容体をコードする遺伝子を単離する事に成功し、ヒトの MCH 受容体蛋白質のアミノ酸配列、ヒトの MCH 受容体をコードする DNA の塩基配列を決定した。さらに、MCH 受容体を発現させ、組み換え蛋白質の生産を可能にし、該遺伝子を含むベクター、該ベク

ターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた MCH 受容体蛋白質、該 MCH 受容体に対する抗体の製造法を確立した。

これにより、該 MCH 受容体および該 MCH 受容体の活性を修飾する物質のスクリーニング、及び MCH の関与する疾患、例えば、肥満、摂食障害予防及び／または治療剤のスクリーニングを可能にし、該スクリーニングにて該受容体の活性を修飾する物質、特にアンタゴニスト活性を有する物質を取得し、本発明を完成した。更に本発明者らは、MCH 受容体のサルにおけるホモログの単離に成功し、それが摂食中枢に局在していることを明らかにした。

すなわち本発明は、以下の蛋白質、それをコードする遺伝子、並びにこの蛋白質を利用した MCH 受容体の活性を修飾する物質、特にアンタゴニスト活性を有する物質のスクリーニング方法に関する。また本発明は、前記受容体活性を修飾する物質、特にアンタゴニスト活性を有する物質、該物質を用いた肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療のための方法、並びに医薬組成物に関する。

〔1〕配列番号：2記載のアミノ酸配列、または配列番号：2記載のアミノ酸配列中の1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、および／または挿入されたアミノ酸配列を有し、かつメラニンコンセントレーティングホルモン受容体活性を示す蛋白質。

〔2〕配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する〔1〕記載の蛋白質。

〔3〕配列番号：1記載の塩基配列で示されるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによりコードされる蛋白質であって、かつ、メラニンコンセントレーティングホルモン受容体活性を示す蛋白質。

〔4〕配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する〔3〕記載の蛋白質。

〔5〕配列番号：8記載のアミノ酸配列を有する〔3〕記載の蛋白質。

〔6〕〔1〕または〔3〕記載の蛋白質をコードする遺伝子。

〔7〕蛋白質が配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する〔6〕記載の遺伝子。

- 6 -

- 〔 8 〕 蛋白質が配列番号： 8 記載のアミノ酸配列を有する〔 6 〕記載の遺伝子。
- 〔 9 〕 〔 6 〕 記載の遺伝子を含むベクター。
- 〔 1 0 〕 〔 9 〕 記載のベクターを含む宿主細胞。
- 〔 1 1 〕 〔 1 0 〕 記載の宿主細胞を培養することを特徴とする〔 1 〕または〔 3 〕記載の蛋白質の製造方法。
- 〔 1 2 〕 〔 1 〕 または〔 3 〕 記載の蛋白質に結合する抗体。
- 〔 1 3 〕 次の工程を含む、メラニンコンセンレーティングホルモン受容体のアンタゴニスト活性を有する物質のスクリーニング方法。
- （ 1 ）メラニンコンセンレーティングホルモンの存在下で〔 1 〕 または〔 3 〕 記載の蛋白質と被験薬を接触させる工程、
- （ 2 ）該蛋白質に対するメラニンコンセンレーティングホルモンの結合活性を測定する工程、および
- （ 3 ）被験薬非存在下で測定した該蛋白質に対するメラニンコンセンレーティングホルモンの結合活性と比較して、工程（ 2 ）で測定された結合活性を低下させる被験薬を選択する工程
- 〔 1 4 〕 次の工程を含む、メラニンコンセンレーティングホルモン受容体のアンタゴニスト活性を有する物質のスクリーニング方法。
- （ 1 ）メラニンコンセンレーティングホルモンの存在下で〔 1 〕 または〔 3 〕 記載の蛋白質を発現する細胞と被験薬を接触させる工程、
- （ 2 ）該蛋白質に対するメラニンコンセンレーティングホルモンの結合による細胞の変化を測定する工程、および
- （ 3 ）被験薬非存在下で測定した細胞の変化と比較して、工程（ 2 ）で測定された細胞の変化を抑制する被験薬を選択する工程
- 〔 1 5 〕 細胞の変化が、GTP 結合活性変化、細胞内 Ca イオン濃度変化、および細胞内 cAMP 濃度変化からなる群から選択されるいずれかの変化である〔 1 4 〕 記載のスクリーニング方法。

- 7 -

〔16〕 メラニンコンセントレーティングホルモン受容体のアンタゴニスト活性を有する物質が、肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療用の物質である〔13〕または〔14〕記載のスクリーニング方法。

〔17〕 〔13〕または〔14〕記載の方法によって選択される、〔1〕または〔3〕記載の蛋白質のアンタゴニスト。

〔18〕 〔17〕記載のアンタゴニストを主成分として含む、肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療のための医薬組成物。

〔19〕 配列番号：1に記載の塩基配列を含むDNA、またはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAからなる、メラニンコンセントレーティングホルモン受容体遺伝子の検出用試薬。

〔20〕 配列番号：1に記載の塩基配列を含むDNA、またはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAと、試料とを接触させ、該DNAを試料中のDNAに対してハイブリダイズさせる工程を含む、メラニンコンセントレーティングホルモン受容体遺伝子の検出方法。

また本発明は、〔17〕記載のアンタゴニストを投与する工程を含む、肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療方法に関する。あるいは本発明は、〔17〕記載のアンタゴニストの、肥満、および／または摂食障害の予防および／または治療のための医薬組成物の製造における使用に関する。

優先日後に公開された WO 00/49046 には、本発明の配列番号：1 記載の塩基配列と配列番号：2 記載のアミノ酸配列が記載されている。しかし、遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定し、その遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を記載しているに過ぎず、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の具体的製造法の記載、前記蛋白質の製造、前記蛋白質の特定の機能及び用途、前記蛋白質が MCH 受容体であるとの記載はない。

本明細書中で使用される「メラニンコンセントレーティングホルモン (MCH) 受容体」は「メラニンコンセントレーティングホルモン (MCH) 受容体蛋白質」

を表す。

本発明の MCH 受容体蛋白質には、

- (1) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体、
- (2) 配列番号：8 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体、
- (3) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列中のいずれかの 1 乃至複数個の部位において、1 乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、および／または挿入されていて、かつ配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体と同一の活性を示す蛋白質（以下、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「同効物」と称する）、
- (4) 配列番号：1 記載の塩基配列で示される DNA と「ストリンジェントな条件」でハイブリダイズする DNA によりコードされる蛋白質であって、かつ配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体と同一の活性を示す（即ち、機能的に同等な）蛋白質（以下、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「ハイブリダイズ同効物」と称する）、及び、
- (5) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列との相同性が 95% 以上であるアミノ酸配列で示され、かつ、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体と「同一の活性」を示す蛋白質（以下、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「相同同効物」と称する）

が含まれる。

配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「同効物」としては、好ましくは配列番号：2 記載のアミノ酸配列において 1 乃至 10 個、更に好ましくは 1 乃至 7 個、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失および／または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同一の活性、即ち MCH 受容体活性を示す蛋白質を挙げることができる。

配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体と「同一の活性」を示す

とは、MCH 受容体活性を示すことであり、例えば実施例 3 記載の方法で確認することができる。すなわち、MCH による容量依存的な細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を指標として、該蛋白質と同一の活性を示すことを確認ができる。配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と「同一の活性」は、実施例 3 記載の条件で、望ましくは $\text{EC}_{50}=3\text{ }\mu\text{M}$ 以下、より望ましくは $\text{EC}_{50}=300\text{ nM}$ 以下である。さらに、実施例 2 記載の条件で、望ましくはヒトの MCH に対する解離定数 $K_d=50\text{ nM}$ 以下、より望ましくは $K_d=5\text{ nM}$ 以下の高い結合親和性を有する。

配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「ハイブリダイズ同効物」をコードする DNA が、配列番号：1 記載の塩基配列で示される DNA とハイブリダイズする、「ストリンジエントな条件」としては、ハイブリダイゼーションのための条件として、「5xSSPE、5xDenhard's 液、0.5% SDS、40% ホルムアミド、200 $\mu\text{g/ml}$ 鮭精子 DNA、37°C オーバーナイト」程度の条件であり、より厳しい条件としては「5xSSPE、5xDenhard's 液、0.5% SDS、50% ホルムアミド、200 $\mu\text{g/ml}$ 鮭精子 DNA、42°C オーバーナイト」程度の条件である。また洗浄のための条件として、緩い条件としては「5xSSC、1% SDS、42°C」、通常「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。

配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「相同同効物」のアミノ酸配列と、配列番号：2 記載のアミノ酸配列との相同性は、少なくとも 95% 以上であるが、より好ましくは、97% 以上の相同性を示す。なおアミノ酸配列の相同性は、BLAST 検索を用い、後述の条件（パラメーター）によって特定することができる。

配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「同効物」、配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「ハイブリダイズ同効物」及び配列番号：2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「相同同効物」をまとめて、本発明における「同効物」と称する。

本発明における「同効物」の好ましい態様として、たとえば配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を示すことができる。配列番号：8に記載のアミノ酸配列は、配列番号：7に記載の塩基配列によってコードされている。配列番号：7に記載の塩基配列からなるcDNAは、MCH受容体の、カニクイザルにおけるホモログとして、本発明者らによって単離された。配列番号：8に記載のアミノ酸配列（カニクイザル）は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列（ヒト）と97%の相同性を持ち、このアミノ酸配列からなる蛋白質は、MCH受容体活性を有することが確認された。

本発明のMCH受容体の起源はヒト及びサルに限定されない。前記（1）～（5）の本発明の受容体のいずれかに該当する限り、例えば、ヒト及びサル以外の生物由来の受容体も、また、配列番号：2又は配列番号：8に記載の配列を基にして、遺伝子工学的に人為的に改変した受容体も、本発明の受容体に含まれる。

また、本発明の受容体は、組換え受容体であることが好ましい。

また、本発明の蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子、即ち、配列番号：2に記載のアミノ酸配列で示されるMCH受容体、あるいは本発明における「同効物」をコードする塩基配列を有する遺伝子、具体的には、上記（1）～（5）に記載の本発明の受容体から選択される蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子である限り、本発明に含まれる。好ましくは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号：1に記載の1番目から1023番目を有する遺伝子である。本発明の「遺伝子」は、DNA及びRNAであり、DNAが好ましい。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の蛋白質、本発明の蛋白質の活性を修飾する物質のスクリーニング方法、本発明の蛋白質に反応する抗体、本発明の医薬について、以下1）～5）に記載する。

1） 本発明のMCH受容体遺伝子の製造方法

- 11 -

a) 第1製造法

本発明の MCH 受容体蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該受容体 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ 2 種類のプライマーを作製する。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該 MCH 受容体 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた MCH 受容体 cDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該受容体蛋白質を製造することができる。

まず、本発明の MCH 受容体の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト脳から該蛋白質をコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ (dT) セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出済 mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマーまたはオリゴ dT プライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする MCH 受容体 DNA を増幅する。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目

- 12 -

的とするDNA断片を得ることもできる。

b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得たmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al. (1976) Cell, 7, 279-288)、Land法(Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo法(Yoo, O.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053)、Okayama-Berg法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えばDH5 α 株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahanの方法(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557-580)、すなわちCaCl₂やMgCl₂またはRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的のMCH受容体蛋白質のDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

(1) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明のMCH受容体の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(³²Pまたは³³Pで標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニト

ロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

(2)ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の MCH 受容体の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R.K. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的の MCH 受容体の全部または一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、該 MCH 受容体を産生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA の断片を ^{32}P または ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

(3)他の動物細胞での MCH 受容体を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞表面に産生させる。本発明の MCH 受容体蛋白質に対する抗体を用いて該蛋白質を検出することにより、元の形質転換株より目的の MCH 受容体をコードする cDNA を有する株を選択する。

(4)本発明の MCH 受容体に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組み込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、本発明の MCH 受容体に対する抗体および該抗体に対する 2 次抗体を用いて、所望の MCH 受容体産生株を検出し、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の MCH 受容体をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法(Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例

例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

c) 第3製造法

配列番号：2、または配列番号：8で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機（例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など）を用いて合成することができる。

d) 第4製造法

本発明の遺伝子を利用して遺伝子工学的手法により得られる物質が本発明のMCH受容体の機能を発現するためには、必ずしも配列番号：2に示されるアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無い。例えばその一部の配列であっても、あるいは他のアミノ酸配列が付加されていても、それが配列番号：2に示されるアミノ酸配列で示されるMCH受容体と「同一の活性」を示す限り、それらの蛋白質もまた本発明の蛋白質に包含される。

また、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ（例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159を参照）、この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もある。したがって、配列番号：2で示されるアミノ酸配列の中の1もしくは複数個の部位において、1もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、および/または挿入されている蛋白質でも配列番号：2記載のアミノ酸配列で示されるMCH受容体と「同一の活性」を有する可能性が高い。前述のとおり、これらの蛋白質は、配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「同効物」であり、本発明に含まれる。これらの「同効物」をコードする塩基配列を有する遺伝子もすべて本発明に含まれる。このような各種の本発明の遺伝子は、上記本発明のMCH受容体の情報に基づいて、例えばホスファイト・ト

リエステル法(Hunkapiller, M. et al. (1984) Nature, 10, 105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはその自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等に従うことができる。

本発明における「同効物」を調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)を利用して本発明の蛋白質をコードするDNAの塩基配列 (配列番号：1) またはその一部をもとに、同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と機能的に同等な、即ち、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と「同一の活性」を示す蛋白質を得ることは、通常行いうることである。このように配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされる蛋白質であって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と「同一の活性」を示す蛋白質、およびそれをコードするDNAもまた本発明に含まれる。前記DNA及び蛋白質は、「ストリンジントな条件」でハイブリダイズするDNA、および、これでコードされる蛋白質であることが好ましく、また、配列番号：1に記載のDNAとハイブリダイズするDNA、および、これでコードされる蛋白質が好ましい。

このような蛋白質をコードするDNAを単離するための生物としては、ヒト以外

- 16 -

に、例えば、サル、ブタ、ウシ、イヌが挙げられるが、これらに制限されない。

配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の「ハイブリダイズ同効物」をコードするDNAを単離するためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、ハイブリダイゼーションのための条件として、「5xSSPE、5xDenhard's 液、0.5% SDS、40% ホルムアミド、200 μ g/ml 鮭精子DNA、37°Cオーバーナイト」程度の条件であり、より厳しい条件としては「5xSSPE、5xDenhard's 液、0.5% SDS、50% ホルムアミド、200 μ g/ml 鮭精子DNA、42°Cオーバーナイト」程度の条件である。また洗浄のための条件として、緩い条件としては「5xSSC、1% SDS、42°C」、通常「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDS、ホルムアミドおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードする蛋白質は、通常、配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ（sgi32bit版、バージョン2.0.12、NCBIより入手）のbl2seqプログラム（Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), FEMS Microbiol Lett. 174:247-250）を用い、デフォルトパラメーターに従って算出できる。ペアワイズ アラインメント パラメータ

- 17 -

ーとして、プログラム名 blastp、Gap 挿入 Cost 値を 0、Gap 伸長 Cost 値を 0、Query 配列のフィルターとして SEG、Matrix として BLOSUM62 を使用する。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて本発明の MCH 受容体蛋白質をコードする DNA の塩基配列 (配列番号 :

1) の一部を基にプライマーを設計し、配列番号 : 2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA の塩基配列と相同性の高い塩基配列を含む DNA 断片を単離し、該 DNA を基に配列番号 : 2 記載のアミノ酸配列を有する MCH 受容体蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。たとえば配列番号 : 9、および配列番号 : 10 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、好ましいプライマーとして挙げられる。このプライマーを用いた取得方法として実施例 6 を例示する。

以上、a) 乃至 d) により得られる DNA の配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980): "Methods in Enzymology" 65, 499-559) や M13 を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J (1982) Gene, 19, 269-276) 等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の MCH 受容体は、下記の方法によって得ることができる。

2) 本発明のベクター、宿主細胞及び蛋白質の製造方法

単離された本発明の蛋白質をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクター DNA に再び組込むことにより、他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell, 2

3, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来 HEK 293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社) 等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4 (Invitrogen 社) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) Med. Immunol., 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F.L. and van der Ed, A.J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6 (Boehringer Mannheim 社) を用いた方法、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) EMBO J., 1, 841-845) 等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G

418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)や pSV2-neo(Southern, P.J. and Berg, P. (1982) J.Mol.Appl.Genet., 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより MCH 受容体を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、zeocin 耐性マーカーとして機能する zeocin 耐性遺伝子を発現し得るベクター、例えば pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen 社)をコ・トランスフェクトし、zeocin 耐性のコロニーを選択することにより MCH 受容体を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293-E BNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-E BNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-E BNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明の蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば受容体蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン

- 20 -

交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明の MCH 受容体を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤 (CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等) で MCH 受容体を可溶化することにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

本発明の蛋白質はマーカ配列とインフレームで融合して発現させることで、該 MCH 受容体の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカ配列と MCH 受容体の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体と Hexa-Histidine tag とをトロンビン認識配列で連結した報告がある (Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)

3) 本発明の蛋白質の活性を修飾する物質 (化合物、ペプチド、及び抗体) のスクリーニング方法

本発明には MCH 受容体の活性を修飾する物質 (化合物、ペプチド、及び抗体) のスクリーニング法が包含される。本発明の蛋白質の活性を修飾する物質とは、人工的に合成された物質や天然に存在する物質を含む。また、有機物質のみならず、無機物質であることもできる。ペプチドには、比較的少ないアミノ酸からなるペプチドの他、酵素などのより多くのアミノ酸からなるペプチドが含まれる。

該スクリーニング法は、前記により構築された MCH 受容体を用いて、該受容体蛋白質の生理学的な特性に応じた該受容体蛋白質の修飾の指標を測定する系に被

験薬を添加し、該指標を測定する手段を含む。MCH 受容体としては、該受容体を発現させた細胞、該細胞の膜分画、又は該受容体蛋白質精製標品などを用いることもできる。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法が挙げられる。また、被験薬は市販の化合物、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137) によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いるが、それらに限らない。

a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明の MCH 受容体に結合する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該受容体蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該受容体蛋白質精製標品を調製する。緩衝液、イオン、pH のようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同受容体蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該受容体蛋白質精製標品を、標識リガンド、例えば $[\text{Phe}^{13}, [^{125}\text{I}]\text{Tyr}^{19}]$ -MCH を被験薬と共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を γ カウンター等で測定する。得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標に該受容体蛋白質のアゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）、あるいはアンタゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。たとえば、本発明のスクリーニング方法によって選択される、該受容体蛋白質のアンタゴニスト活性を有する物質は、肥満、あるいは摂食障害の治療や予防に有用である。

- 22 -

本発明のスクリーニング法としては、実施例 2 または、実施例 4 記載の条件で行うことが好ましい。

たとえば実施例 4 記載のアッセイ条件で、 K_i が $10\ \mu\text{M}$ 以下、 IC_{50} が $16\ \mu\text{M}$ 以下、更に好ましくは K_i が $1\ \mu\text{M}$ 以下、 IC_{50} が $1.6\ \mu\text{M}$ 以下の結合阻害活性の物質を選択することができる。

b) GTP γ S 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明の MCH 受容体の活性を修飾する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）は GTP γ S 結合法によりスクリーニングすることが可能である（Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br.J.Pharmacol. 109, 1120-1127）。該受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 50mM GDP 溶液中で、 ^{35}S で標識された GTP γ S 400pM と混合する。被験薬存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP γ S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被験薬存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、該 MCH 受容体のアゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。また、被験薬存在下における、MCH による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該受容体蛋白質のアンタゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。

c) 細胞内 Ca^{++} および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法

本発明の MCH 受容体の活性を修飾する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）は、MCH 受容体を発現させた細胞の細胞内 Ca^{++} または cAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。細胞内の Ca^{++} 濃度の測定は fura2 や fluo3 等を用いて測定することができる。また cAMP 濃度の測定は、市販の cAMP 測定キット (Amersham 社等) を用いて測定できる。

あるいは、 Ca^{++} や cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより、間接的に Ca^{++} および cAMP 濃度を測定することが可能で

ある。具体的には以下の方法で、 Ca^{++} および cAMP 濃度を測定することができる。まず、セラムレスポンスエレメントあるいは cAMP レスポンスエレメントをつないだレポーター遺伝子を該受容体蛋白質を発現させた細胞に導入し、被験薬を該細胞の培養液中に加える。レポーター遺伝子には、検出可能なシグナルを生成することができる任意の遺伝子を用いることができる。例えばルシフェラーゼ遺伝子は、レポーター遺伝子として望ましい。37°Cで4時間インキュベート後、培地を除去し、細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定する。そして被験薬添加時のルシフェラーゼ活性誘導を指標に該受容体蛋白質のアゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。また、被験薬を該細胞の培養液中に添加後、最終濃度 0.4nM の MCH を添加し同様にルシフェラーゼ活性を測定する。そして、被験薬添加時の MCH によるルシフェラーゼ活性誘導の阻害を指標に、該受容体蛋白質のアнтаゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法においては、該蛋白質を発現させた細胞と発現させていない宿主細胞（コントロール細胞）に物質（化合物、ペプチド、及び抗体）等を一定時間作用させ、 Ca^{++} および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該蛋白質を発現させた細胞特異的な Ca^{++} の上昇および／または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。また、被験薬存在下における、MCH による Ca^{++} の上昇および／または cAMP 濃度の上昇または低下の阻害作用を指標に該 MCH 受容体のアンタゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング法は、実施例 3 または実施例 5 記載の条件で行うことが好ましい。

たとえば実施例 3 に記載の条件で、 $\text{EC}_{50}=100\text{ }\mu\text{M}$ 以下の物質を、更に好ましくは $\text{EC}_{50}=10\text{ }\mu\text{M}$ 以下の物質をアゴニスト活性を有する物質として、選択す

- 24 -

ることができる。また、実施例3に記載のアッセイ条件に被験薬を追加することにより、即ち、実施例5の条件で IC₅₀ が 30 μ M 以下の物質を、好ましくは IC₅₀ が 10 μ M 以下の物質を、更に好ましくは IC₅₀ が 1 μ M 以下の物質をアンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

4) 本発明の MCH 受容体に反応する抗体の作成方法

本発明の MCH 受容体に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該 MCH 受容体や該 MCH 受容体の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明の MCH 受容体をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) J. Infect. Dis., 173, 314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵からポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

抗体を調製するための好ましい例として実施例8記載の方法を挙げる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature, 256, 495-497) により当業者が容易に製造することが可能である。

本発明の蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミ

- 25 -

エローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10～30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2～4 日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10～20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。

このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。また、モノクローナル抗体またはその一部分を含む抗体断片は該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

- 26 -

さらには、本発明の MCH 受容体に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法 (Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al. (1994) Nature, 368, 856-859) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

5) 本発明の医薬

本発明には、MCH 受容体または前記スクリーニング法により選択された該蛋白質の活性を有意に修飾する物質 (化合物、ペプチド、及び抗体) を有効成分とする医薬が包含される。

本発明の MCH 受容体活性修飾物質 (化合物、ペプチド、及び抗体) を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる薬理学上許容される担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて医薬組成物として調製されうる。本発明の医薬組成物は、好ましくは該受容体のアンタゴニスト活性を有する物質を有効成分とする肥満及び摂食障害の予防及び／又は治療用医薬組成物である。あるいは本発明は、前記アンタゴニスト活性を有する物質を投与する工程を含む、肥満及び摂食障害の予防及び／又は治療方法である。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つまたはそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃

- 27 -

至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣または胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。例えば経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60kg として）において、1 日につき約 0.1~100 mg、好ましくは 0.1~50mg である。また非経口投与の場合、注射剤の形では 1 日につき 0.01~50mg、好ましくは 0.01~10mg である。

本発明はまた、診断薬としての MCH 受容体をコードする DNA の使用法が包含される。機能障害と関連した MCH 受容体遺伝子の変異型の検出は、MCH 受容体の過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾患またはその罹病性の診断に利用される。すなわち本発明は、配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する DNA に関する。本発明において、配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DN

- 28 -

Aとは、その相補鎖を含む。したがって、本発明のDNAは、配列番号：1に記載の塩基配列を含むDNA、またはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAを含む。また本発明のDNAと「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のDNAとハイブリダイズし、他のDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。このようなDNAは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15ヌクレオチド～100ヌクレオチド、好ましくは15ヌクレオチド～40ヌクレオチドの鎖長を有する。配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAを増幅するためのPCR用プライマーとして例えば、配列番号：3（フォワードプライマー）および配列番号：4（リバープライマー）、配列番号：5（フォワードプライマー）および配列番号：6（リバープライマー）、配列番号：11（フォワードプライマー）および配列番号：12（リバープライマー）を使用できる。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列（またはその相補配列）を有し、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長のDNAが用いられる。好ましくは、配列番号：1に記載の塩基配列の1番目から1023番目を有するDNAが用いられる。

診断用のDNAは、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から得ることができる。欠失および挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅DNAを標識MCH受容体ヌクレオチドとハイブリダイズさせることで同定できる。完全にマッチした配列とミスマッチの二重鎖とはRNアーゼ消化により、または融解温度の差異により区別できる。また、DNAの塩基配列の差異を、DNA断片のゲル電気泳動における泳動度の変性剤の有無による変化に基づいて検出することができる。または直接DNA塩基配列決定によっても、塩基配列の差異を検出で

きる (Myers, B.M. et al. (1985) Science. 230, 1242-1246)。特定位置での配列変化はヌクレアーゼプロテクションアッセイ (例えば、RNアーゼおよびS1プロテクション) または化学的開裂法によっても確認できる (Cotton et al. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85, 4397-4401)。

また、MCH受容体のヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。このアレイ技法は公知で、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変異性を解析するために用いられている (Chee, M. et al. (1996) Science, 274, 610-613)。さらに、被験者から得られたサンプルからのMCH受容体のレベルの異常な低下または増加を測定する方法により、MCH受容体の過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾患またはその罹病性の診断に利用される。発現の低下または増加は、当業者で公知のポリヌクレオチド定量法のいずれか、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼプロテクション、ノーザンブロット、その他のハイブリダイゼーション法によりRNAレベルで測定することができる。

その他、被験者から得られたサンプル中のMCH受容体のような蛋白質のレベルの低下または増加は当業者で公知のアッセイ法により測定できる。こうしたアッセイ法として、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット法、ELISAアッセイなどがある。

また、「配列番号：1に記載の塩基配列を含むDNA、またはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15ヌクレオチド以上、好ましくは100ヌクレオチド、さらに好ましくは500ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、3000ヌクレオチド以内、好ましくは2000ヌクレオチド以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明のタンパク質の異常 (機能異常や発現異常) などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられ

- 30 -

る。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のDNA）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)）などにより調製することが可能である。本発明によるアンチセンスDNAを用いてMCH受容体遺伝子をノックアウトすることにより、MCH受容体が関与する疾患の解明を進めることができる。

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法などにより患者へ投与を行う。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図1は、サル外側視床下部におけるGPRv17蛋白質の分布を免疫組織染色によって解析した結果を示す写真である。

- 1 外側視床下部を含むサル視床下部
- 2 外側視床下部の拡大写真
- 3 外側視床下部におけるGPRv17蛋白質を発現する神経細胞
- 4 外側視床下部におけるGPRv17蛋白質を発現する神経細胞

略号

Fx 脳弓

LH 外側視床下部

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

(実施例 1) 新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv17 をコードする遺伝子の単離

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv17 をコードする全長 cDNA は、PCR により取得した。GPRv17 をコードする遺伝子の増幅には、ヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAATCCATTTCATGCATCTTGTTGGA-3' (配列番号: 3)、リバープライマーとして 5'-CTAAAAGTGTGATTTTCAGAGTGTTCCTCC-3' (配列番号: 4) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 1 に示す。

同配列は 1023 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 1 の第 1 番目から第 1023 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (340 アミノ酸) を配列番号: 2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

更に「GPRv17」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索を行った。その結果、「GPRv17」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では HUMAN PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR SLC-1 (Q99705, 402aa) に対して、38% で最も高い相

- 3 2 -

同性を示した。このことから「GPRv17」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。SLC-1 は、本発明の蛋白質と同様に MCH をリガンドとする蛋白質であることが明らかにされている(Saito, Y. et al. (1999) Nature 400, 265-269)。しかし両者のアミノ酸配列における相同性はわずかに 38%であり、本発明の蛋白質は新規なものと考えられた。

(実施例 2) 293 細胞による GPRv17 蛋白質の発現と [Phe¹³, [¹²⁵I]Tyr¹⁹]-MCH との結合実験

以下の実験によって GPRv17 がコードする蛋白質の MCH 受容体活性を確認した。まずこの cDNA がコードする GPRv17 蛋白質を発現させるために、当該 cDNA をヒト脳由来の poly(A)⁺ RNA (Clontech 社) を鋳型として RT-PCR により取得し、発現ベクターに組み込んだ。

実際には、GPRv17 蛋白質をコードする全長 cDNA の増幅には、フォワードプライマーとして 5'-GGTCTAGAATGAATCCATTTTCATGCATCTTGTT-3' (配列番号: 5)、リバースプライマーとして 5'-GGTCTAGACTAAAAGTGTGATTTTCAGAGTGTTT-3' (配列番号: 6) を用いた (それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある)。RT-PCR は Ex Taq DNA polymerase (宝酒造社) を用い 5% DMSO 存在下で 94 °C (30 秒) / 55 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS plasmid (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。得られたプラスミドは pEF-BOS-GPRv17 とした。

Type I Collagen をコートした 10cm 培養シャーレ (旭テクノグラス社) に 293 細胞を 1×10^6 細胞で播種して 24 時間培養後、9 μ g の pEF-BOS-GPRv17 及び 1 μ g の pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen 社) を FuGENE6 (Boehringer Mannheim 社) を用い

- 33 -

て遺伝子導入した。遺伝子導入 30 時間後に新たに 10cm 培養シャーレに播種しなおし、40 $\mu\text{g/ml}$ の zeocin (Invitrogen 社) で選択し、生き残ってコロニーを形成した細胞を回収し、本発明の GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞を得た。

該細胞を回収し洗浄後、0.32M sucrose に懸濁して Dounce homogenizer にてホモジェナイズした。1,300xg で 10 分間遠心して脱核を行い、その上清を再度 12,000xg で 15 分間遠心して沈殿画分を得た。これを、0.0075% の Triton-X100 を含む 50mM Tris.HCl (pH7.4) に懸濁し、4°C で 30 分間ゆっくり攪拌を行った後、12,000xg で 15 分間遠心し、得られた沈殿を 5mM Tris.HCl (pH7.4) で一回、50mM Tris.HCl (pH7.4) , 10mM MgCl_2 , 2mM EGTA, aprotinin, pepstatin A で二回洗浄し、これを膜画分とした。

膜画分 20 μg に $[\text{Phe}^{13}, [^{125}\text{I}]\text{Tyr}^{19}]$ -MCH (NEN Life Science Products; Inc) を最終濃度 $0.07 \sim 5.7 \times 10^{-9}$ M になるように加え、50mM Tris.HCl (pH7.4) , 10mM MgCl_2 , 2mM EGTA, 1mg/ml bacitracin, 1mg/ml ovalbumin, 10KIU/ml aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A からなる溶液 200 μl 中で室温 30 分間インキュベーションし、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターに回収された放射活性を γ カウンターで測定し、膜画分への総結合量を定量した。

さらに、前述の試験に最終濃度 1 μM または 2 μM の MCH (Bachem 社) を加えることで、膜画分への非特異的結合量を測定した。pEF-BOS-GPRv17 を安定に導入した 293 細胞の膜画分への $[\text{Phe}^{13}, [^{125}\text{I}]\text{Tyr}^{19}]$ -MCH の総結合量と非特異的結合量から特異的結合を検出した結果、いずれの場合も、 $0.07 \sim 5.7 \times 10^{-9}$ M の $[\text{Phe}^{13}, [^{125}\text{I}]\text{Tyr}^{19}]$ -MCH 濃度で特異的結合が観察された。

最終濃度 2 μM の MCH (Bachem 社) を加えた際の、この結合の Scatchard 分析を行った結果、pEF-BOS-GPRv17 を安定に導入した 293 細胞の膜画分に対する $[\text{Phe}^{13}, [^{125}\text{I}]\text{Tyr}^{19}]$ -MCH の結合の解離定数は $K_d = 1.8 \text{ nM}$ で、最大結合は $B_{\text{max}} = 890 \text{ fmol/mg protein}$ であった。

- 34 -

以上のように、本発明の GPRv17 蛋白質は、MCH に強い親和性を持つことが確認された。

(実施例 3) GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞の MCH による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化

96well Black/clear bottom plate, collagen I coated (BECTON DICKINSON 社製)に GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^4 細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、 $4 \mu\text{M}$ Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid および 10% FBS を含む DMEM を 1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を 20mM HEPES を含む Hanks BSS (GIBCO 社製) で 4 回洗浄して、1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ の 20mM HEPES を含む Hanks BSS を添加した。

細胞内 Ca^{++} 濃度の変化は FLIPR (Molecular Device 社製) を用いて経時的に測定した。すなわち、測定開始 10 秒後に MCH (Bachem 社) を最終濃度 2×10^{-6} M から 1×10^{-12} M になるように添加し、添加後、50 秒間は 1 秒ごとに、さらに 4 分間は 6 秒ごとに蛍光強度を測定した。GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞は、 $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-10}$ M の MCH 濃度で容量依存的な細胞内 Ca^{++} 濃度の変化が観察された。一方、空ベクターを遺伝子導入した細胞では MCH による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化は観察されなかった。細胞内 Ca^{++} 濃度の変化データの蛍光強度の最高値を縦軸に、MCH の濃度を横軸にプロットし、Logistic 回帰法により用量依存性を解析した結果、 $\text{EC}_{50}=130\text{nM}$ であることがわかった。

以上のように本 GPRv17 蛋白質で形質転換した細胞は MCH に反応して用量依存的に細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を誘導することが確認され、GPRv17 蛋白質は MCH 受容体であることが確認できた。細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を測定することでアゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングが可能となった。

- 3 5 -

(実施例 4) GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞を用いた GPRv17 蛋白質と [Phe¹³, [¹²⁵I]Tyr¹⁹]-MCH の結合を阻害する物質のスクリーニング

実施例 2 で作製した GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞の膜画分を用いて [Phe¹³, [¹²⁵I]Tyr¹⁹]-MCH の結合を阻害する活性を指標に被験薬の試験を行った。被験薬としては、市販されている化合物を用いた。基本的に実施例 2 の方法に従い、若干の変更を加えた。膜画分 15 μ g を含む実施例 2 記載の溶液 100 μ l 中に被験薬を添加し、更に 1×10^{-9} M の [Phe¹³, [¹²⁵I]Tyr¹⁹]-MCH を添加して結合反応を行った。回収された放射活性はグラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、トップカウント (Packard 社) にて測定した。また、同時に前述の試験において被験薬を添加しないもの、非標識のリガンドを加えたものをそれぞれ総結合量、非特異的結合量として放射活性を測定した。この様な条件で、IC₅₀ が 10 μ M 以下の化合物として、化合物 A (FAB-MS (M+H)⁺ 307)、B (FAB-MS (M+H)⁺ 383)、C (FAB-MS (M+H)⁺ 365) が得られた。化合物 A、B、C の IC₅₀ はそれぞれ 0.22、3.0、3.3 μ M であり、いずれも GPRv17 蛋白質と [Phe¹³, [¹²⁵I]Tyr¹⁹]-MCH の結合を用量依存的に阻害する強い結合阻害活性を示した。

(実施例 5) GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞を用いた MCH による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を阻害する物質のスクリーニング

実施例 3 の条件に、被験薬を添加し、5 分後に 75nM の MCH を添加し、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化を実施例 3 と同じ条件で測定した。例えば実施例 4 で選択した化合物 A、B、C の IC₅₀ はそれぞれ 1.7、13、16 μ M であり、全て GPRv17 蛋白質安定発現 293 細胞における MCH による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を用量依存的に抑制する、GPRv17 蛋白質の強いアンタゴニストであることが明らかとなった。

(実施例 6) サル GPRv17 遺伝子のクローニング

サル GPRv17 をコードする全長 cDNA は、PCR により取得した。サル GPRv17

- 36 -

をコードする遺伝子の増幅には、サル脳前頭葉由来の cDNA を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAATCCATTTCATCTTGTTGGA-3' (配列番号 : 9)、リバープライマーとして 5'-CTAAAAGTGTGATTCAGAGTGTTC-3' (配列番号 : 10) を用いた。PCR は実施例 1 の条件で行った。

明らかになった配列を配列番号 : 7 に示す。同配列は 1023 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 7 の第 1 番目から第 1023 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (340 アミノ酸) を配列番号 : 8 に示す。このアミノ酸配列はヒト GPRv17 蛋白質のアミノ酸配列と 97% と高い相同性を有しており、サルの GPRv17 蛋白質をコードしていることが明らかになった。

サル GPRv17 蛋白質を 293 細胞に一過性に発現し MCH による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を試験した。実施例 2 と同様に、サル GPRv17 をコードする cDNA を pEF-BOS plasmid に挿入し、pEF-BOS-monkey GPRv17 を得た。96well Black/clear bottom plate, collagen I coated に 293 細胞を 1 ウェルあたり 1×10^4 細胞で播種して一晩培養後、1 ウェルあたり 20ng の pEF-BOS-GPRv17 もしくは pEF-BOS-monkeyGPRv17 を FuGENE6 (Boeringer Mannheim 社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に培地を廃棄し、実施例 3 の条件で細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を測定した。サル GPRv17 蛋白質一過性発現 293 細胞では、ヒト GPRv17 一過性発現 293 細胞同様に MCH 容量依存的な細胞内 Ca^{++} 濃度の変化が観察された。その際の EC50 は 171nM であった。この様にサル GPRv17 遺伝子も機能的な MCH 受容体であることが明らかになった。

(実施例 7) 組織におけるヒト GPRv17 の遺伝子発現分布

ノーザンブロットハイブリダイゼーション法によりヒト GPRv17 遺伝子の発現分布を解析した。ヒト GPRv17 遺伝子のプローブには cDNA 断片 (配列番号 : 1 の第 1 番目から第 1023 番目) を用いた。ヒトの各臓器由来の polyA RNA (2 μ g) を

- 37 -

プロットしたメンブレン(Clontech 社)とプローブのハイブリダイゼーションは 5×SSPE、5×denhardt's、0.5% SDS、50%ホルムアミド、200μg サケ精子DNA を含む溶液中で、42°C(18 時間)で行った。メンブレンは、2×SSPE、0.1% SDS を含む溶液で 1 回、1×SSPE、0.1% SDS を含む溶液で 1 回、最終的に 0.5×SSPE、0.1% SDS を含む溶液で 2 回、いずれも 65°C、15 分洗浄した。

ヒトの各臓器(脳、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球)について解析した結果、脳で 4.0 kb の mRNA が強く検出された。その他の末梢組織での発現は検出感度以下であった。

更に PCR 法により詳細に脳内での発現分布を解析した。PCR にはヒトの脳各部位(扁桃核、尾状核、海馬、黒質、小脳、前頭葉、視床下部、脳下垂体、全脳)由来の cDNA を鋳型として、配列番号: 11 で示されるオリゴヌクレオチド 5'-TGC AATCCCAGTGTACCAAAACAGAGAG-3' をフォワードプライマーとして、また配列番号: 12 で示されるオリゴヌクレオチドを 5'-CAGTGAGGCCACAGTGTGGAGGGCAAGG-3' リバースプライマーとして用いた。PCR には Ex taq (宝酒造) を用い、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 40 回繰り返した。

この結果、その機能の一つとして摂食機能を司る視床下部で発現が認められることがわかった。又、大脳皮質(前頭葉)、海馬、扁桃核、尾状核、黒質でも発現が認められたが、小脳、下垂体では発現が認められなかった。

(実施例 8) 抗ヒト GPRv17 抗血清の作成

GPRv17 の C 末端に相当するペプチド CEKEINNMGNTLKSHF を多種品目同時固相法自動ペプチド合成装置 PSSM-8 (島津製作所) を用いて合成した。合成したペプチドは SepPakC18 (Waters 社) を用いて精製した。乾燥重量で 2mg の精製ペプチドと 2mg のキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を Inject Maleimide Activated mcKLH kit (Pierce 社)を用いて結合させ、KLH コンジュゲートとした。注

- 38 -

射筒内で 0.2mg の KLH 相当の KLH コンジュゲート(0.25ml)と 0.25ml の TiterMax Gold (フナコシ社) をソニケーションにより混和しエマルジョンを作製した。前記エマルジョンを日本白色ウサギ 2 羽の背部皮下に数カ所投与し免疫した。この免疫操作を 2 週間おきに 8 回行った。8 回免疫後、耳静脈より採血し、抗血清を調製した。

ヒトおよびサル GPRv17 蛋白質を一過的に発現させた COS 細胞を用い、間接蛍光抗体法により抗体の反応性を確認した。10cm 培養シャーレ(旭テクノグラス社)に COS 細胞を 1×10^6 細胞で播種して 24 時間培養後、20 μ g の pEF-BOS-GPRv17 あるいは 20 μ g の pEF-BOS-monkey GPRv17 を FuGENE6 (Boehringer Mannheim 社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 18 時間後にタイプ I コラーゲンをコートした 8 ウェル培養スライド(Becton-Dickinson 社)に 2×10^4 細胞/ウェルで播種し直し、更に 22 時間培養した。

4%パラホルムアルデヒドを含む 100mM リン酸緩衝液(pH7.4)で室温 30 分間固定し、0.1M グリシンを含むリン酸緩衝液で洗浄後、0.2% TritonX-100 を含むリン酸緩衝液で室温 5 分間インキュベーションした。2%ヤギ血清を含むリン酸緩衝液で室温 30 分間ブロッキング後、同じ溶液で 100~1000 倍希釈した本抗ヒト GPRv17 抗血清と室温で 1 時間反応させた。リン酸緩衝液で洗浄後、FITC 標識したヤギ抗ウサギイムノグロブリン抗体(Biosource 社)と室温 1 時間反応させた。リン酸緩衝液、蒸留水で洗浄後、封入しコンフォーカル顕微鏡にて観察した。

この結果、100~1000 倍希釈した本抗血清は、ヒト GPRv17 及びサル GPRv17 により一過的に形質転換した COS 細胞においてシグナルを与えた。一方、同様に一過的にヒト SLC-1 で形質転換した COS 細胞では全くシグナルを与えなかった。従って、ヒト及びサル GPRv17 蛋白質を特異的に検出する抗血清が得られた。

(実施例 9) 抗ヒト GPRv17 抗血清による GPRv17 蛋白質のサル視床下部における分布解析

実施例 8 で作製した抗ヒト GPRv17 抗血清を用い、サル視床下部における GPRv17 蛋白質の分布を解析した。

雄カニクイザル(6.3才, 体重 9.65 kg, ハムリー株式会社より購入)をペントバルビタールナトリウム深麻酔下にて、頸動脈を切断し、放血致死させた。その後速やかに脳を取り出して厚さ 5 mm にスライスし、4%パラホルムアルデヒドを含む 100mM リン酸緩衝液(pH7.4)を用いて 4℃で 2 日間の浸潤固定を行った。さらに 16%ショ糖を含む 100mM リン酸緩衝液(pH7.4)に 2 日間浸した後、視床下部を含む脳組織を切りだしてドライアイスにて急速凍結し、ミクロトームにて厚さ 20 μ m の凍結切片を作製した。

500 μ m おきに調製した一連のサル視床下部切片を 2% H_2O_2 を含む 0.3% Triton X-100、100mM リン酸緩衝液(pH7.4)で室温 30 分間処理し、10%スキムミルクでブロッキング後、1%スキムミルクを含む同溶液で 3000 倍希釈した実施例 8 記載の抗ヒト GPRv17 抗血清と 4℃で 3 日間反応させた。抗原抗体反応の検出には ABC 法(Vector Laboratories 社キット)にて行った。又サル視床下部諸核の同定は、連続切片をニッスル染色し、The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates(Paxinos, G. et al (2000) Academic Press, NY)を参考に行った。

解析結果は図 1 に示した。この結果、視床下部では外側視床下部の一部の神経細胞にほぼ限局してシグナルが認められ、神経細胞体表面および樹上突起の染色が認められた。グリア細胞は染色されなかった。又免疫前血清を用いて同じ条件で試験した結果、外側視床下部神経細胞の染色は全く認められなかった。従って、GPRv17 はサル視床下部において主に外側視床下部の一部の神経細胞上に存在していることがわかった。外側視床下部は古くより摂食中枢として知られており、GPRv17 蛋白質は外側視床下部において、MCH の有する摂食制御機能を介在することがわかった。

産業上の利用の可能性

- 4 0 -

本発明は新規な MCH 受容体を提供する。本発明の受容体は、MCH の関与する疾患、肥満及び摂食障害例えばカケクチア、拒食症、過食症の予防及び／または治療剤としての該受容体の活性を修飾する薬物の探索及び評価に有用であり、該受容体の関与する疾患に対する治療薬を提供することができる。また、本発明の MCH 受容体をコードする DNA は MCH 受容体の製造に利用されるのみならず、MCH 受容体の変異や異常な発現変動に起因する疾患の診断に有用である。該受容体のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該受容体作用薬、診断薬または蛋白質の分離精製の手段等に有用である。

請求の範囲

1. 配列番号：2記載のアミノ酸配列、または配列番号：2記載のアミノ酸配列中の1乃至複数個の部位において、1乃至複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、および/または挿入されたアミノ酸配列を有し、かつメラニンコンセンストレーティングホルモン受容体活性を示す蛋白質。
2. 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載の蛋白質。
3. 配列番号：1記載の塩基配列で示されるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによりコードされる蛋白質であって、かつ、メラニンコンセンストレーティングホルモン受容体活性を示す蛋白質。
4. 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する請求項3記載の蛋白質。
5. 配列番号：8記載のアミノ酸配列を有する請求項3記載の蛋白質。
6. 請求項1または請求項3記載の蛋白質をコードする遺伝子。
7. 蛋白質が配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する請求項6記載の遺伝子。
8. 蛋白質が配列番号：8記載のアミノ酸配列を有する請求項6記載の遺伝子。
9. 請求項6記載の遺伝子を含むベクター。
10. 請求項9記載のベクターを含む宿主細胞。
11. 請求項10記載の宿主細胞を培養することを特徴とする請求項1または請求項3記載の蛋白質の製造方法。
12. 請求項1または請求項3記載の蛋白質に結合する抗体。
13. 次の工程を含む、メラニンコンセンストレーティングホルモン受容体のアンタゴニスト活性を有する物質のスクリーニング方法。
 - (1) メラニンコンセンストレーティングホルモンの存在下で請求項1または請求項3記載の蛋白質と被験薬を接触させる工程、
 - (2) 該蛋白質に対するメラニンコンセンストレーティングホルモンの結合活性を測定する工程、および

- 4 2 -

(3) 被験薬非存在下で測定した該蛋白質に対するメラニンコンセントレーティングホルモンの結合活性と比較して、工程(2)で測定された結合活性を低下させる被験薬を選択する工程

14. 次の工程を含む、メラニンコンセントレーティングホルモン受容体のアンタゴニスト活性を有する物質のスクリーニング方法。

(1) メラニンコンセントレーティングホルモンの存在下で請求項1または請求項3記載の蛋白質を発現する細胞と被験薬を接触させる工程、

(2) 該蛋白質に対するメラニンコンセントレーティングホルモンの結合による細胞の変化を測定する工程、および

(3) 被験薬非存在下で測定した細胞の変化と比較して、工程(2)で測定された細胞の変化を抑制する被験薬を選択する工程

15. 細胞の変化が、GTP結合活性変化、細胞内Caイオン濃度変化、および細胞内cAMP濃度変化からなる群から選択されるいずれかの変化である請求項14記載のスクリーニング方法。

16. メラニンコンセントレーティングホルモン受容体のアンタゴニスト活性を有する物質が、肥満、および/または摂食障害の予防および/または治療用の物質である請求項13または請求項14記載のスクリーニング方法。

17. 請求項13または請求項14記載の方法によって選択される、請求項1または請求項3記載の蛋白質のアンタゴニスト。

18. 請求項17記載のアンタゴニストを主成分として含む、肥満、および/または摂食障害の予防および/または治療のための医薬組成物。

19. 配列番号: 1に記載の塩基配列を含むDNA、またはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAからなる、メラニンコンセントレーティングホルモン受容体遺伝子の検出用試薬。

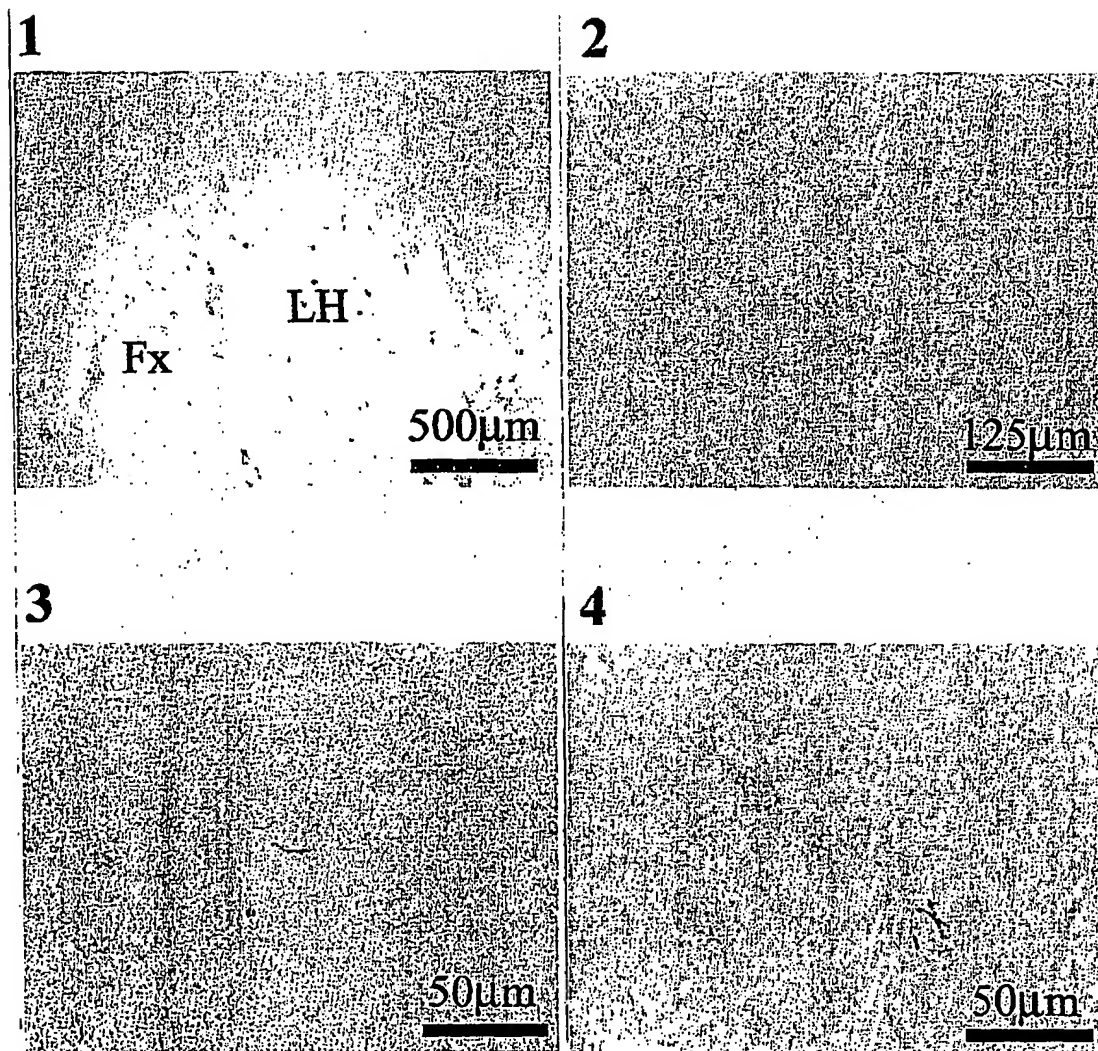
20. 配列番号: 1に記載の塩基配列を含むDNA、またはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAと、試料とを接触

- 43 -

させ、該DNAを試料中のDNAに対してハイブリダイズさせる工程を含む、メラニンコンセントレーティングホルモン受容体遺伝子の検出方法。

1/1

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

HELIX RESEARCH INSTITUTE

<120> Novel Melanin-Concentrating-Hormone Receptor.

<130> YH0102-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-088588

<151> 2000-03-24

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1023

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

2/13

atgaatccat ttcatgcatc ttgttggaac acctctgccg aactttttaa caaatcctgg 60
aataaagagt ttgcttatca aactgccagt gtggtagata cagtcacct cccttccatg 120
attgggatta tctgttcaac agggctggtt ggcaacatcc tcattgtatt cactataata 180
agatccagga aaaaaacagt ccctgacatc tatatctgca acctggctgt ggctgatttg 240
gtccacatag ttggaatgcc ttttcttatt caccaatggg ccgaggggg agagtgggtg 300
tttggggggc ctctctgcac catcatcaca tccctggata cttgtaacca atttgctgt 360
agtgccatca tgactgtaat gagtgtggac aggtactttg ccctcgtcca accatttcga 420
ctgacacgtt ggagaacaag gtacaagacc atccggatca atttgggcct ttgggcagct 480
tcctttatcc tggcattgcc tgtctgggtc tactcgaagg tcatcaaatt taaagacggt 540
gttgagagtt gtgcttttga tttgacatcc cctgacgatg tactctggta tacactttat 600
ttgacgataa caactttttt tttccctcta cccttgattt tgggtgtgcta tattttaatt 660
ttatgctata cttgggagat gtatcaacag aataaggatg ccagatgctg caatcccagt 720
gtacccaaac agagagtgat gaagttgaca aagatggtgc tgggtgctgt gtagtcttt 780
atcctgagtg ctgcccctta tcatgtgata caactggtga acttacagat ggaacagccc 840
aactggcct tctatgtggg ttattacctc tccatctgtc tcagctatgc cagcagcagc 900
attaaccctt ttctctacat cctgctgagt ggaaatttcc agaaacgtct gcctcaaate 960
caaagaagag cgactgagaa ggaaatcaac aatatgggaa acactctgaa atcacacttt 1020
tag 1023

<210> 2

<211> 340

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

3/13

Met Asn Pro Phe His Ala Ser Cys Trp Asn Thr Ser Ala Glu Leu Leu

1 5 10 15

Asn Lys Ser Trp Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Gln Thr Ala Ser Val Val

20 25 30

Asp Thr Val Ile Leu Pro Ser Met Ile Gly Ile Ile Cys Ser Thr Gly

35 40 45

Leu Val Gly Asn Ile Leu Ile Val Phe Thr Ile Ile Arg Ser Arg Lys

50 55 60

Lys Thr Val Pro Asp Ile Tyr Ile Cys Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu

65 70 75 80

Val His Ile Val Gly Met Pro Phe Leu Ile His Gln Trp Ala Arg Gly

85 90 95

Gly Glu Trp Val Phe Gly Gly Pro Leu Cys Thr Ile Ile Thr Ser Leu

100 105 110

Asp Thr Cys Asn Gln Phe Ala Cys Ser Ala Ile Met Thr Val Met Ser

115 120 125

Val Asp Arg Tyr Phe Ala Leu Val Gln Pro Phe Arg Leu Thr Arg Trp

130 135 140

4/13

Arg Thr Arg Tyr Lys Thr Ile Arg Ile Asn Leu Gly Leu Trp Ala Ala
145 150 155 160

Ser Phe Ile Leu Ala Leu Pro Val Trp Val Tyr Ser Lys Val Ile Lys
165 170 175

Phe Lys Asp Gly Val Glu Ser Cys Ala Phe Asp Leu Thr Ser Pro Asp
180 185 190

Asp Val Leu Trp Tyr Thr Leu Tyr Leu Thr Ile Thr Thr Phe Phe Phe
195 200 205

Pro Leu Pro Leu Ile Leu Val Cys Tyr Ile Leu Ile Leu Cys Tyr Thr
210 215 220

Trp Glu Met Tyr Gln Gln Asn Lys Asp Ala Arg Cys Cys Asn Pro Ser
225 230 235 240

Val Pro Lys Gln Arg Val Met Lys Leu Thr Lys Met Val Leu Val Leu
245 250 255

Val Val Val Phe Ile Leu Ser Ala Ala Pro Tyr His Val Ile Gln Leu
260 265 270

Val Asn Leu Gln Met Glu Gln Pro Thr Leu Ala Phe Tyr Val Gly Tyr

5/13

275 280 285

Tyr Leu Ser Ile Cys Leu Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Asn Pro Phe

290 295 300

Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Asn Phe Gln Lys Arg Leu Pro Gln Ile

305 310 315 320

Gln Arg Arg Ala Thr Glu Lys Glu Ile Asn Asn Met Gly Asn Thr Leu

325 330 335

Lys Ser His Phe

340

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

atgaatccat ttcatgcatc ttgttgga

6/13

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

ctaaaagtgt gatttcagag tgtttccc

28

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

ggctctagaat gaatccattt catgcatctt gtt

33

7/13

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

ggctctagact aaaagtgtga tttcagagtg ttt

33

<210> 7

<211> 1023

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 7

atgaatccat ttcactcadc ttgttggaa acctctgccg aactttcaaa caaatcctgg 60
aataaagagt ttgcttatca aactgccagt gctgtagata cagtcaccc ccttccatg 120
attgggatta tctgttcaac agggctgggt ggcaacatcc tcattgtatt cactataata 180
aggtccagaa aaaaaacagt ccctgacatc tatactctgca acctggctgt ggctgatttg 240
gtccacatca ttggaatgcc ttttcttatt caccagtggg cccgaggggg agagtgggta 300

8/13

tttgggggc ctctctgcac catcatcaca tccctggata cttgtaacca atttgccctgt 360
 agtgccatca tgactgtaat gagtgtggac aggtactttg ccctcgtcca accatttcga 420
 ctgacaagtt ggagaacaag gtacaagacc atccggatca atttgggcct ttgggcagct 480
 tccttttatcc tggcattgcc tgtctggatc tactcgaagg tcatcaaatt taaagacggt 540
 gtcgagagtt gtgcttttga ttgacatcc cctgacgatg tactctggta tacactttat 600
 ttgacaataa caactttcct tttccctcta cccttgattt tgggtgctta tattttaatt 660
 ttatgctata cttgggagat gtatcaacag aataaggatg ccagatgttg caatcccagc 720
 gtacaaaaac agagagtgat gaagttgaca aagatgggtgc tgggtgctggt ggcagtcttt 780
 atcctaagtg ctgcccctta tcatgtgata caactgggtga acttacagat ggaacagccc 840
 aactggcct tctatgtggg ttattacctc tccatctgtc tcagctatgc cagcagcagc 900
 attaaccttt ttctctacat cctgctgagt ggaaatttcc agaaacgtct gcctcaaadc 960
 caaaggagag tgactgacaa ggaaatcaaa aatatgggaa acactctgaa atcacacttt 1020
 tag 1023

<210> 8

<211> 340

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 8

Met Asn Pro Phe His Ser Ser Cys Trp Asn Thr Ser Ala Glu Leu Ser

1

5

10

15

Asn Lys Ser Trp Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Gln Thr Ala Ser Ala Val

20

25

30

9/13

Asp Thr Val Ile Leu Pro Ser Met Ile Gly Ile Ile Cys Ser Thr Gly

35

40

45

Leu Val Gly Asn Ile Leu Ile Val Phe Thr Ile Ile Arg Ser Arg Lys

50

55

60

Lys Thr Val Pro Asp Ile Tyr Ile Cys Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu

65

70

75

80

Val His Ile Ile Gly Met Pro Phe Leu Ile His Gln Trp Ala Arg Gly

85

90

95

Gly Glu Trp Val Phe Gly Gly Pro Leu Cys Thr Ile Ile Thr Ser Leu

100

105

110

Asp Thr Cys Asn Gln Phe Ala Cys Ser Ala Ile Met Thr Val Met Ser

115

120

125

Val Asp Arg Tyr Phe Ala Leu Val Gln Pro Phe Arg Leu Thr Ser Trp

130

135

140

Arg Thr Arg Tyr Lys Thr Ile Arg Ile Asn Leu Gly Leu Trp Ala Ala

145

150

155

160

Ser Phe Ile Leu Ala Leu Pro Val Trp Ile Tyr Ser Lys Val Ile Lys

10/13

165

170

175

Phe Lys Asp Gly Val Glu Ser Cys Ala Phe Asp Leu Thr Ser Pro Asp

180

185

190

Asp Val Leu Trp Tyr Thr Leu Tyr Leu Thr Ile Thr Thr Phe Phe Phe

195

200

205

Pro Leu Pro Leu Ile Leu Val Cys Tyr Ile Leu Ile Leu Cys Tyr Thr

210

215

220

Trp Glu Met Tyr Gln Gln Asn Lys Asp Ala Arg Cys Cys Asn Pro Ser

225

230

235

240

Val Pro Lys Gln Arg Val Met Lys Leu Thr Lys Met Val Leu Val Leu

245

250

255

Val Ala Val Phe Ile Leu Ser Ala Ala Pro Tyr His Val Ile Gln Leu

260

265

270

Val Asn Leu Gln Met Glu Gln Pro Thr Leu Ala Phe Tyr Val Gly Tyr

275

280

285

Tyr Leu Ser Ile Cys Leu Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Asn Pro Phe

290

295

300

11/13

Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Asn Phe Gln Lys Arg Leu Pro Gln Ile
305 310 315 320

Gln Arg Arg Val Thr Asp Lys Glu Ile Lys Asn Met Gly Asn Thr Leu
325 330 335

Lys Ser His Phe
340

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

atgaatccat ttcactcatc ttgttgga

28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

12/13

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

ctaaaagtgt gatttcagag tgtttccc

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

tgcaatccca gtgtaccaaa acagagag

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

13/13

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

cagtgaggcc acagtgtgga gggcaagg

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/02, A61K45/00, A61P3/04, A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq
MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 00/49046, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD), 24 August, 2000 (24.08.00) & AU, 2573900, A	1-12
A	Saito Y, et al., "Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor", Nature, Vol.15, No.400, pp.265-269 (1999)	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 May, 2001 (09.05.01)Date of mailing of the international search report
22 May, 2001 (22.05.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02343

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 17,18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is unknown what are included in the scope of medicinal compositions containing, as the main ingredient, the antagonist according to the invention as set forth in claim 17 and the antagonist according to the invention as set forth in claim 18. Thus, no search can be practiced thereon.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1' C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/02, A61K45/00, A61P3/04, A61P25/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1' C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 00/49046, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD) 24. 8 月. 2000 (24. 08. 00) & AU, 2573900, A	1-12
A	Saito Y, et al. "Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor" Nature, Vol. 15, No. 400, p. 265-269 (1999)	1-20
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 09. 05. 01.	国際調査報告の発送日 22.05.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 8114 印

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 17, 18 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲17のアンタゴニスト及び請求の範囲18のアンタゴニストを主成分とする医薬組成物に係る発明については、どのようなものが包含されるのかが不明であり、調査ができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。